

**Ermittlung der altersabhängigen Mittelwerte
des Serumkomplementanteils Beta-1A/C bei Kindern**

Ulrich Ewert

1974

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. K. Betke

Ermittlung der altersabhängigen Mittelwerte
des Serumkomplementanteils Beta-1A/C bei Kindern

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktor-
würde in der Zahnheilkunde verfaßt und einer Hohen
Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von
Ulrich Ewert
aus
München

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Privatdozent Dr. K.-D. Tympner

Mitberichterstatter : Professor Dr. K. Betke

Dekan : Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 30. Juli 1974



I N H A L T

	Seite
I Einleitung	3
II Das Komplementsystem	
1. Definition und Bedeutung	4
2. Die Komplementreaktion	9
3. Physiologie des Komplements	15
4. Pathologie des Komplements	15
5. Bestimmung der Komplementkonzentration	17
III Methodik	21
1. Herstellen der Serumverdünnungen	21
2. Einfüllen der Serumverdünnungen	22
a. Hamilton - Spritzensystem	23
b. Dispensersystem	25
3. Das Ablesen	28
4. Bezugskurve und Auswertung	28
IV Klinisches Material	
1. Gewinnung des Materials	32
2. Vorbereitung	33
3. Untersuchungen	34
4. Auswahl des Materials	34

	Seite
V Untersuchungen	
1. Beta 1A/C - Werte	35
2. Gesamteiweiß - Werte	35
3. Alterung	36
VI Ergebnisse	36
VII Diskussion	44
VIII Zusammenfassung	47

I EINLEITUNG

In den vielen verschiedenartigen Situationen, in denen es im Organismus zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion kommt, hängen die sich daraus ergebenden Folgen nicht nur von der Primärreaktion ab, sondern auch von der sekundär erfolgenden Aktivierung eines komplexen Systems unspezifischer Faktoren des Blutes und der Gewebsflüssigkeiten, die insgesamt als Komplement bezeichnet werden.

Im Jahre 1898 beobachtete Bordet erstmalig, daß Kaninchen-Antiseren gegen Schaferythrozyten, welche in frischem Zustand die Erythrozyten in hoher Verdünnung zu lysieren vermögen, ihre Hämolysefähigkeit durch Altern oder Erhitzen (30 Min. bei 56°C) weitgehend verlieren. Er fand jedoch, daß die hämolytische Aktivität durch Zusatz von frischem Serum verschiedener Tierarten völlig wieder hergestellt werden kann, nicht aber durch Zusatz von gealterten oder erhitzten Seren. Dieser im normalen Serum vorhandene, hitzelabile Faktor wurde damals als "Alexin", auch als "Alpha-Lysin" bezeichnet und später durch den Namen Komplement ersetzt. (1)

In den ersten Jahren nach seiner Entdeckung hatte der als Komplement bezeichnete Faktor keine praktische Bedeutung für die Serologie. Über seine Rolle konnte bestenfalls spekuliert werden. Durch die Entdeckung

der Komplement-Bindungsreaktion (KBR) erlangte das Komplement dann als serologisches Indikatorsystem eine überragende Bedeutung für die Laboratoriumstechnik. In den Jahren 1906 bis 1926 stellte sich heraus, daß das Komplement ein System aus mehreren Einzelfaktoren ist. (2)

Die Kenntnis von der Rolle des Komplements in vivo ist bis vor ungefähr zehn Jahren auf dem Stand geblieben, der zum Zeitpunkt seiner Entdeckung gegeben war.

Erst zu Beginn der sechziger Jahre zeichneten sich Möglichkeiten ab, konkretere Aussagen über die biologische Rolle des Komplementsystems im Organismus zu treffen. Die Voraussetzungen hierzu ergaben sich aus den Fortschritten der Protein-Chemie. Dadurch wurde es möglich, die Isolierung der einzelnen Komplementfaktoren und ihre Zuordnung zu bestimmten biologischen Einzelaktivitäten vorzunehmen. (3)

II DAS KOMPLEMENTSYSTEM

1. Definition und Bedeutung

Das Komplement ist ein System von z.Zt. neun bekannten Proteinen im Normalserum, welches unter definierten Bedingungen zur Hämolyse von sensibilisierten Erythrozyten (EA) befähigt ist; bei diesem Vorgang werden eine

Reihe biologisch aktiver Substanzen freigesetzt (WHO).

Die Bevorzugung der Zytolyse als Definitionskriterium hat seinen Grund in der dominierenden Rolle der Zytolyse bei der Auffindung und Charakterisierung der heute bekannten neun Komplementproteine. Darüber hinaus ermöglicht es in vitro einen überaus empfindlichen Nachweis aller in vivo wirksamen Komplementkomponenten. (4)

Die Folgen der durch Antigen-Antikörper-Reaktion initiierten Komplementaktivierung sind u.a. Bakteriolyse, Zytolyse und Hämolyse (lytisches Prinzip).

Bei der Bakteriolyse handelt es sich um eine innerhalb weniger Minuten erfolgende irreversible Schädigung von bestimmten Bakterien. Eine große Zahl gramnegativer Bakterien, z.B. Escherichien, Salmonellen, Proteus, Shigellen und Brucellen, sowie auch viele Amöben, Ciliaten und Trypanosomen werden abgetötet, geschädigt oder immobilisiert. Durch Komplementaktivierung werden jedoch nicht alle Bakterien abgetötet. Grampositive Keime sind im allgemeinen - auch wenn sie Komplement binden - gegen Komplementaktivierung resistent. (5)

Die zytotoxische Wirkung des aktivierten Komplements gegen Zellen und Gewebe wurde an Hand von menschlichen Amnionzellen und homologen Kaninchen-Antikörpern, dann in Gewebskulturen sowie bei der Reaktion zwischen Tumorzellen und Isoantikörpern beobachtet und untersucht. (6)

Die hämolytische Wirkung stellt sich am klassischen Modell der Immunhämolyse von Schaferythrozyten nach Reaktion mit Kaninchen - Antikörpern, sowie auch am Modell der Donath-Landsteiner-Reaktion zwischen menschlichen Erythrozyten und bithermischen Hämolysinen dar. (6)

Der gesamte Vorgang spezifischer Reaktion zwischen Erythrozyten und Antikörpern mit Komplementbindung und anschließender Hämolyse wird als Immunhämolyse bezeichnet. Es tritt jedoch keine echte Lyse der Zelle ein. Die zellulär ablaufende Antigen-Antikörper-Reaktion an und für sich verursacht keine Zellschädigung, sie stellt den Auslösemechanismus zur Komplementaktivierung dar, die dann Mikroperforationen (100 Angström bei Humanserum) an den Erythrozyten herbeiführt. Es kommt zu einer Permeabilitätsstörung, zu einer osmotischen Dysregulation der Zelle. Die Immunhämolyse verläuft als Reaktionskette in folgender Reihenfolge: Antigen-Antikörper-Reaktion, Komplementaktivierung, Entstehung von Membrandefekten, Zelluntergang. (6)

Bei dem lytischen Prinzip müssen alle neun Komplementkomponenten (C'1 bis C'9) aktiviert werden. Daneben führt aber auch schon die teilweise Aktivierung der Komplementkette zu biologisch aktiven Substanzen:

Anaphylatoxine:

Diese sind Histaminliberatoren. Es handelt sich um Metaboliten von C'3 und C'5. (7)

Die Bildung von Anaphylatoxin geht nur mit Beteiligung des Komplementsystems vor sich. (1)

Faktor der Leukozytenchemotaxis

Antigen-Antikörper-Komplexe führen in Gegenwart von Komplement zur Bildung einer Substanz, die auf neutrophile Granulozyten stark chemotaktisch wirkt.

Es sind zwei Faktoren bekannt:

1. Der sogenannte hochmolekulare, chemotaktische Faktor (er entspricht einem Komplex von aktiviertem C'5, C'6 und C'7).
2. Ein Faktor, welcher von C'3 her stammt. (7)

Faktoren zur Förderung der Immunadhärenz und der Opsonisierung

Bei der Immunadhärenz handelt es sich um eine Erscheinung, bei der sich Partikel (z.B. Bakterien), die mit Antikörpern oder kleineren Antigen-Antikörper-Komplexen behaftet sind, sich in vitro an Thrombozyten vieler Spezies oder an Erythrozyten von Primaten (nicht aber an Thrombozyten von Primaten) anheften. Die Immunadhärenz ist abhängig vom Komplement und tritt bei Abwesenheit von Komplement nicht auf.

Solche Immunkomplexe, die auf diese Art aneinanderhaften, werden leichter durch Phagozyten aufgenommen. Auch wird die Phagozytose von Partikeln wie z.B. Bakterien durch spezifische Antikörper (thermolabile Serumstoffe) gefördert. Der Opsonierungseffekt seiner-

seits wird durch Anwesenheit von Komplement wesentlich gesteigert. (9)

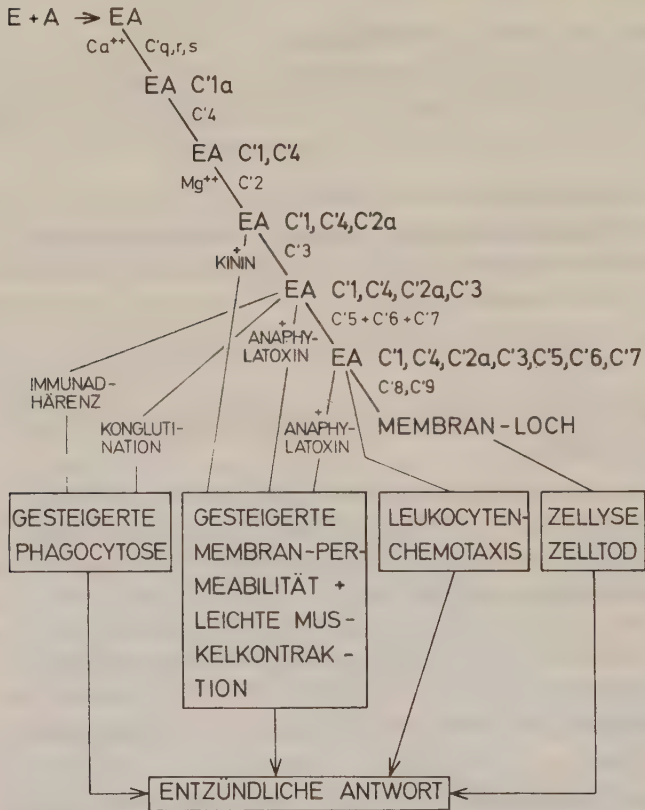


Abb. 1 : Überblick über die Komplementreaktion

E = Erythrozyt A = Antikörper

2. Komplementreaktion

Das Komplementsystem kann in drei Bereiche gegliedert werden. Die Mehrzahl der bis jetzt bekannten biologischen Aktivitäten tritt im mittleren Drittel der Sequenz (C'3, C'5, C'6) auf.

Das letzte Drittel der Sequenz erfüllt die Spezialfunktion der Cytolyse.

Die Komponenten des ersten Drittels setzen durch ihre Interaktion mit dem Antikörper des Immunkomplexes die Gesamtreaktion in Gang; sie ermöglichen dadurch erst die biologischen Leistungen des Systems. (3)

Die Komplementreaktion stellt eine Reaktionskette dar, die aus zahlreichen Teilreaktionen besteht, deren Beginn mit der Abbindung der ersten reaktiven Komponente einsetzt und deren Ende beim membranschädigenden Angriff der letzten Komponente zu suchen ist.

Einige der früher nur als Komplementaktivitäten bezeichneten Wirkungen kann man heute Proteinen zuschreiben. Einzelne Abschnitte der Komplementreaktionen werden bereits als Enzym-Substratreaktionen bezeichnet. (6)

Die Nomenklatur der Komplementfaktoren stammt aus einem Vorschlag von Müller Eberhard (26) und Lepow. Danach werden die Untereinheiten der klassischen C'1-Komponente mit Buchstaben näher bezeichnet (C'1q, r, s).

Die Dritte und nach klassischer Ansicht letzte Komponente der Reaktionsfolge (C'3) wird nun in weitere

Komponenten aufgeschlüsselt, wobei jetzt die erste Teilkomponente als C'3 bezeichnet wird, während sämtliche anschließende Teilkomponenten mit fortlaufenden Nummern bei C'5 beginnend, bezeichnet werden.

Die Bezeichnung EA am Beginn der Reaktion wird als Symbol der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Erythrozyten (E) und Antikörper (A) gesetzt. Ein aktiver Komplementkomplex an Erythrozyten wird durch die Beifügung des Buchstaben "a" neben der Komplementangabe gekennzeichnet.

Die vereinigten Teilkomponenten C'1q, C'1r, C'1s stellen die erste aktivierte Komplementkomponente C'1a dar. (6) (siehe Abb.1)

EA C'1a:

Der erste Schritt besteht in der Anlagerung von C'1q an den AG-AK-Komplex (hier EA). Danach folgen C'1r und C'1s. Dazu sind Ca^{++} - Ionen nötig, die wahrscheinlich als Bindeglieder fungieren und den ganzen C'1-Komplex zusammenhalten.

C'1s liegt im Plasma als Protease (d.h. in inaktiver Form) vor, die während des Anlagerungsvorganges durch bisher unbekannte Mechanismen in eine aktive Esterase überführt wird und welche für den Beginn der nächsten Reaktionsschritte verantwortlich ist.

EA C'1a, C'4 :

C'1a wandelt C'4 in eine andere, etwas kleinere Form um, die sich an die Zelloberfläche oder an einen Antigen-Antikörper-Komplex anlagern kann, während zur gleichen Zeit ein Teil des C'4 inaktiviert wird.

EA C'1a, C'4, C'2a :

C'2 wird an C'4 angelagert, durch Einwirkung von C'1a gespalten und zur selben Zeit in ein aktives Enzym überführt. Hierzu sind Mg^{++} - Ionen erforderlich. Der aktive Komplex ist C'4, C'2; nun kann C'1a verloren gehen oder künstlich entfernt werden (z.B. durch Behandlung mit Ca^{++} - bindenden Substanzen, etwa Äthylendiamintetraessigsäure = EDTA), ohne die folgenden Reaktionsschritte zu beeinträchtigen. Aktiviertes C'2 ist wahrscheinlich eine Esterase. Es ist instabil und zerfällt sehr rasch in eine selbständige, inaktive Form C'2i.

EA C'1a, C'4, C'2a, C'3 :

C'3, die am meisten im Humanserum vorhandene Komponente, wird durch den aktiven C'4, 2a-Komplex in eine aktive Form überführt, die sich selbst sehr schnell an die angrenzende Zellmembran anlagert. Wenn die Aktivierung in Lösung stattfindet und C'3 nicht an die Zellmembran angelagert wird, so wird es in eine inaktive Form C'3i umgewandelt. (1) Nach Müller Eberhard kommt C'3 in drei verschiedenen molekularen Formen vor. Das native C'3 Molekül (1. Form) wird nach dem Zusammentreffen mit EA, C'1a, 4, 2a enzymatisch aktiviert, wobei die labile aktivierte Form (2. Form), vielleicht nur eine Konformationsänderung, mit dem Rezeptor der Zelloberfläche reagieren kann. Die aktivierte Form wäre jedoch nur kurzlebig und verändert sich in die stabile inaktivierte Form C'3i, die sich nicht mehr an Zellen fixieren kann.

Auf die radiäre Immundiffusion hat dieser Unterschied zwischen aktivem und inaktivem C'3 keinen meßbaren Einfluß. (8)

Auf Grund dieser Kurzlebigkeit der instabilen, aktiven Form und der räumlich bedingten Begrenzung ihrer Abbindemöglichkeit an den aktivierenden EA C'1a, 4, 2a-Bereich müßte sich eine Minorität der aktivierten C'3 Moleküle abbinden können, während das Gros als inaktive, stabile Form in die Flüssigkeitsphase zurückkehrt. (6)

In der Immunelektrophorese entspricht das inaktivierte C'3 dem Beta-1C. Durch die oben beschriebene *in vivo* Aktivierung entsteht aus dem Großteil des C'3-Komplementanteils als nicht zellgebundenes C'3 das C'3i, das in der Immunelektrophorese als Beta-1A sichtbar wird. (7)

Während der Umwandlung von C'3 in C'3i entsteht Anaphylatoxin.

Der Komplex C'1a, 4, 2, 3 hat verschiedene biologisch wichtige Eigenschaften und nimmt die Schlüsselstellung bei der Immunadhärenz, Phagozytose und Konglutination ein. (1) (siehe Abb.1)

EA C'1a, 4, 2a, 3, 5, 6, 7

An den Reaktionsvorgang C'1a, 4, 2a, 3 schließt sich die Abbindung der fünften Komplementkomponente an, deren Aktivität einem als Beta-1F definiertem Globulinmolekül zugeschrieben wird. (6)

Durch die Anlagerung von drei Komponenten wird der labile Komplex EA C'1a, 4, 2a in einen stabilen Zustand überführt. Beta 1C-Globulin (C'3) ist die eine Komponente, Beta-1F-Globulin (C'5) die andere

und C'6 ist die dritte Komponente.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß auch die Abbindung von C'7 für die funktionelle Wechselwirkung noch benötigt wird. (11)

Ein stabiler Komplex tritt erst dann auf, wenn Beta-1F (C'5) im Reaktionsgemenge vorliegt. Es dürfte eine enzymatische Wirkung ausüben, wobei C'5 und C'6 einen Komplex bilden, bevor sie mit dem Ca C'1a,4,2a,3 - Aggregat in Reaktion treten. EA C'1a,4,2a - Komplexe haben die Tendenz C'2a zu verlieren. (12)

Aktiviertes C'7 reagiert wahrscheinlich direkt mit der Zellmembran, indem es permanent gebunden wird. Die Zellmembran ist zu diesem Zeitpunkt noch intakt. Auch wird der Komplex erst ab hier für die Leukozytenchemotoxis zugänglich.

EA C'1a,4,2a,3,5,6,7,8,9

Die beiden letzten identifizierten Faktoren C'8, C'9 reagieren darauf hintereinander.

Das Endresultat ist eine irreparabel geschädigte Zellmembran. Im Falle der Erythrozyten äußert sich dies in einer osmotischen Schwellung und Sprengung, während bei anderen Zellen die Auflösung, die der Störung des inneren Gleichgewichts folgt, ohne besondere Schwellung zur Sprengung der Leptosomen und zum Untergang führt.

Die Veränderungen sind elektronenmikroskopisch sichtbar. Es werden Membrandefekte sichtbar, die im Humanserum als Löcher von 103 Angström Durchmesser erkannt werden. (Meerschweinchen 83 Angström)

Es scheint geklärt zu sein, daß pro voll ablaufender Komplementaktivierung je ein solcher Membrandefekt entsteht. Nach Mayer (13,14) soll ein komplementaktiver "Treffer" an der Erythrozytenoberfläche genügen, um die Zelle zur Immunhämolyse zu bringen ("one-hit-theory")

ÜBERSICHT DER MENSCHLICHEN KOMPLEMENTKOMPONENTEN

SYNONYM	C'1q	C'1r	C'1s	C'4	C'2	C'3	C'5	C'6	C'7	C'8	C'9
INAKTIVIERUNG DURCH			C'1-PRO-ESTERASE	β 1E-GLOBULIN	α β -GLOBULIN	β 1C-GLOBULIN	β 1F-GLOBULIN				
	DIISOPROPYLFLUORPHOSPHAT α -NEURAMINGLYCOPROTEIN Ca ⁺⁺ -BINDEnde SUBSTANZEN(EDTA)			HYDRAZIN AMMONIAK		ZYMOSAN COBRATOXIN	COBRATOXIN				
SEDIMENTATIONS-KOEFFIZIENT	11,1	7	4	10	6	9,5	8,7	5-6	6-7	8	4
ELEKTROPHORET. BEWEGLICHKEIT	γ_2	β	α_2	β_1	β_2	β_1	β_1	β_2	β_2	γ_1	α_2 - α_1
SERUMKONZENTRATIONEN(mg/100ml)	2-3			3-5	< 1	80-150	3-5	<1			
THERMOLABILITÄT (30 min 56°C)	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+

Tabelle 1 (1)

3. Physiologie des Komplements

Es ist unbestimmt, in welchen Zellen oder Geweben die meisten Komplementkomponenten gebildet werden, da es schwierig ist, sie zu identifizieren und zu messen. Es hat sich jedoch gezeigt, daß C'1 im menschlichen Kolon und Ileum gebildet wird, offensichtlich durch Epithelzellen.

C'3 wird größtenteils oder hauptsächlich in der Leber produziert. C'3 kommt in verschiedenen allotypischen Formen vor, die sich durch ihre elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten unterscheiden. (C'3 entspricht Beta-1C, C'3i entspricht Beta-1A). Diese sind für jedes Individuum charakteristisch.

Man nimmt an, daß C'2 von Makrophagen gebildet wird, aber wahrscheinlich sind auch andere Zellen an der C'2-Bildung beteiligt. Über die Synthese ist noch wenig bekannt, so daß unsicher ist, ob der im Krankheitsfall niedrige Titer auf einen vermehrten Verbrauch oder eine verminderte Synthese zurückzuführen ist. (1)

4. Pathologie

Es kommen auch gewisse erbliche Mängel einzelner Komplementkomponenten vor, ähnlich dem Mangel von Faktoren des Blutgerinnungssystems. Wenn sie gegenwärtig nicht untersucht sind, so könnte das daran liegen, daß die Komplementaktivität des Serums selten untersucht wird, und daß Techniken zur Messung

der Aktivität einzelner Komponenten erst seit kurzem zur Verfügung stehen.

Das Fehlen von C'1, wahrscheinlich verursacht durch den Mangel der C'1q-Komponente wurde bei einem Kind gefunden, welches mit einer Thymusaplasie geboren worden war.

Ein Fall von erblichem C'2-Mangel wurde bei scheinbar gesunden Personen gefunden, bei denen rein zufällig ein Fehlen der hämolytischen Komplementaktivität entdeckt wurde. Hier war nur der C'2-Titer im Serum sehr niedrig (obgleich C'2 abhängige Reaktionen wie Immunadhärenz und Bakterizidie kaum beeinträchtigt waren).

Eine zweite Art von C'2-Mangel findet man bei Patienten mit hereditärem angioneurotischem Ödem, was auf kontinuierliche Aktivierung und spontanen Zerfall auf Grund der ungehemmten Wirkung des C'1a zurückzuführen ist. (1)

Der C'3-Defekt selbst scheint nach den bisherigen Kenntnissen von der zentralen Bedeutung und der biologischen Wirkung dieser Komponente mit dem Leben nicht vereinbar zu sein.

Ein C'5-Defekt beim Menschen tritt klinisch als Neigung zu schwersten rezidivierenden Infekten mit gramnegativen Bakterien in Erscheinung. Das Krankheitsbild kann nur durch Zufuhr von humanem C'5 gebessert werden. (3)

Ein absoluter C'5-Mangel kommt auch bei gewissen Inzuchtstämmen von Mäusen vor und ein absoluter C'6-Mangel wurde bei Inzuchtstämmen von Kaninchen gefunden. (1)

Auch hier schienen die Tiere gesund zu sein. Die Seren solcher Stämme waren für die Erforschung und die Charakterisierung der Komplementfaktoren von großer Wichtigkeit.

5. Bestimmung der Komplementkonzentration

Bis vor kurzem wurde die Gesamtkomplementaktivität anhand seiner lytischen Fähigkeiten beurteilt, d.h. die Komplementeigenschaft mit spezifischen Antikörpern sensibilisierte Erythrozyten zu hämolysieren.

Eine meist 2-5%ige Hammelerythrozytensuspension wurde in einem geeigneten Mischverhältnis mit spezifischen Hämolysinen versetzt (15, 16). Zu diesem hämolytischen System als Indikator wurden abgestufte Mengen des auf seinen Komplementgehalt zu untersuchenden Serums hinzugefügt. Der Komplementtiter wurde in der Serummenge ausgedrückt, die eine 100%ige Hämolysen der sensibilisierten Erythrozyten herbeizuführen vermag. Die Ablesung der Hämolysen erfolgte durchweg visuell. (17)

Wadsworth und Mitarbeiter (18) haben zuerst auf diese Unzulänglichkeit der Bestimmungsmethode hingewiesen. Mayer und Mitarbeiter (19, 20) arbeiteten

dann eine neue Arbeitsvorschrift für die quantitative Bestimmung der hämolytischen Aktivität des Gesamtkomplexes aus.

Danach wird der 50%ige Hämolysetiter statt der Komplementmenge, die zu einer 100%igen Lyse des hämolytischen Systems erforderlich ist, bestimmt. Auf diese Weise kann die komplementunabhängige Fähigkeit des Humanserums, eine Hämolyse auch nicht sensibilisierter Hammelerythrozyten herbeizuführen (21), ausgeschaltet werden. Die unspezifische Hämolysefähigkeit des Serums ist nämlich der spezifischen, komplementunabhängigen Hämolyse deutlich unterlegen. Sie büßt dementsprechend ihre Wirksamkeit durch die zunehmende Serumverdünnung bedeutend schneller ein als das Komplement, so daß bei Verdünnungen, die den 50% - Hämolysetiter bestimmen, ihre Wirkung bereits erloschen ist. (22,17)

Diese Technik ist jedoch relativ aufwendig und die Durchführung ist nicht zuletzt deshalb auf Speziallaboratorien beschränkt geblieben. In den letzten Jahren gelang es, einzelne Komplementkomponenten zu reinigen. Da es sich um Proteine handelt, konnten spezifische Antikörper erzeugt werden, mit deren Hilfe sich die entsprechenden Komplementfaktoren bestimmen lassen. C'3 wurde 1960 gereinigt und in der Immunelektrophorese als Beta-1A/C identifiziert. (7) Die Globuline Beta-1C und Beta-1A sind zwei Erscheinungsformen des gleichen Serumproteins (23,24).

Zwischen beiden Formen können in vitro fließende Übergänge beobachtet werden. Das frische Serum enthält nur Beta-1C-Globulin. Bei zunehmender Serumalterung erscheint ein immer größer werdender Anteil an Beta-1A-Globulin. Dieser Übergang kann durch Inkubation bei 56°C wesentlich beschleunigt werden. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß im fließenden Blut nur Beta-1C-Globulin vorhanden ist und allein im Komplementsystem aktiv beteiligt ist.

Andererseits besteht zwischen dem Beta-1C- und dem Beta-1A-Globulin eine spezifische Antigengemeinschaft, die praktisch soviel bedeutet, daß man mit einem Anti-Beta-1C- oder Anti-Beta-1A-Serum sowohl das Beta-1C- als auch das Beta-1A-Globulin präzipitieren kann.

Diese Tatsache ermöglicht es aber, die zur Zeit der Blutentnahme vorhanden gewesene Höhe der Komplementaktivität auch nach einem längeren Zeitraum der Serum Aufbewahrung über die Menge des Beta-1A/C-Globulins festzustellen. Die Gesamtmenge des Beta-1A/C-Globulins bleibt nämlich auch nach längerem Stehen des Serums konstant, wenn auch das Verhältnis Beta-1C: Beta-1A Änderungen unterworfen ist. (17)

Nach Marghescu besteht zwischen der 50% Hämolysetiter-Aktivität des Gesamtkomplements und der Menge des Beta 1A/C-Globulins (mg/100ml) ein enger Zusammenhang. Danach besteht zwischen dem 50% Hämolysetiter und der Menge des Komplementbestandteils Beta-1A/C ($C'3$) bei hundert Freiheitsgraden und $r = 0,321$ eine mit $P = 0,001$ statistisch signifikante Korrelation.

Dadurch vereinfacht sich die Komplementbestimmung für klinische Zwecke. Es genügt demnach, anstelle der aufwendigen und mit vielen Fehlermöglichkeiten behafteten Bestimmung des 50%-Hämolysetiters lediglich die Menge des Beta-1A/C-Globulins zu messen, um daraus auf die Gesamtkomplementaktivität schließen zu können. (17)

Andererseits gibt es Untersuchungen, die auf die klinische Bedeutung der Bestimmung der Komplementaktivität hinweisen.

Verschiedene Autoren (Marghescu S., Bläker et al., P.S.Grob et al., u.a.) stellten übereinstimmend fest, daß bei einigen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematoses, Colitis ulcerosa, Sklerodermie, Dermatomyositis sowie malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems, akuter und chronischer Hepatitis, rheumatoider Arthritis und nach Streptokokken-Infektion auftretender Glomerulonephritis die Beta-1A/C-Werte erniedrigt waren. (2,4,17,27-33)

Für die Diagnostik und zur Beurteilung des Verlaufs dieser Erkrankungen sind wiederholte Bestimmungen des C'3-Komplementwertes unerlässlich.

Zur Auswertung der Ergebnisse sind "Normalwerte" von "klinisch gesunden" Kindern notwendig. Bei Durchsicht der Literatur konnten nur vereinzelt Vergleichswerte gefunden werden. (8,34)

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin aufzuzeigen, wie sich die C'3-Komplementwerte bei Kindern in verschiedenen Altersgruppen verhalten.

III METHODIK

Die quantitative Bestimmung des Beta 1A/C-Globulins für die ersten 68 Seren erfolgte mit monospezifischen Antiseren in Partigenplatten der Behringwerke Marburg nach dem Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion nach MANCINI et al. (10)

Im Prinzip handelt es sich hierbei um den Vergleich der Größe von Präzipitationsringen eines spezifischen Antiserums gegen das zu untersuchende Plasmaprotein auf einer Agar-Gel-Immundiffusionsplatte.

Als Testserum wurde ein stabilisiertes Standard-Humanserum für immunologische Plasma-Protein-Bestimmungen, eine Mischung von Sera gesunder Erwachsener verwendet.

Das verwendete Standardserum hatte die OP Nr. 570 AK und enthielt 75mg/100ml Beta 1A/C. Die Platten stammten aus der Serie 570 AK und hatten einen Meßbereich von 10 - 80 mg/100ml. Der Arbeitsvorgang selbst gestaltete sich wie folgt:

1. Herstellen der Serumverdünnungen

Wie bei jeder quantitativen, immunologischen Bestimmung mittels Immunpräzipitation, spielt auch hier das richtige Verhältnis zwischen Antigen und Antikörper eine wichtige Rolle, da sich im Falle eines Antigenüberschusses bereits gebildete Immunkomplexe wieder lösen und dadurch das Ergebnis beeinträchtigen können. (17)

Für die Aufstellung der Bezugskurve wurde das Standard-Humanserum in den geforderten Verdünnungen 1:6, 1:2 und 1:1 mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt und das zu untersuchende Serum ebenfalls mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1:3 verdünnt (1:1 = unverdünnt).

Die Immundiffusionsplatten enthielten als Konservierungsmittel Natriumacid (1mg/ml)

2. Einfüllen der Serumverdünnungen

Die in die Partigenplatten vorgestanzten Löcher waren für die Aufnahme von 0,002ml Flüssigkeit geeicht.

Berücksichtigt man die Verdünnung des Serums und die geringe Menge des Einfüllvolumens je Untersuchung, so wird die Wichtigkeit einer exakten Dosierung - wenn gültige quantitative Aussagen gemacht werden sollen - besonders deutlich. Um eine mögliche Fehlerquelle beim Verdünnen der Serumprobe so gering wie möglich zu halten, wurden Mikroliterpipetten verwendet.

War die Herstellung der Verdünnungen der Standardseren mit Mikroliterpipetten auch relativ problemlos, da die verarbeiteten Flüssigkeitsmengen bei den Verdünnungen 1:6 und 1:2 sich in Größenordnungen bewegten, wo auftretende Ungenauigkeiten einen vertretbaren Fehler nach sich zogen, so bereitete die geforderte Einfüllmenge von 0,002ml Schwierigkeiten.

Diesen Schwierigkeiten versuchten wir damit zu begegnen, indem besondere Einfüllsysteme verwendet wurden:

1. Hamilton - Spritzensystem
2. Dispenser - System, empfohlen von den Behringwerken

Beide Methoden wurden in vergleichenden Untersuchungen überprüft. Es stellte sich eine gute Übereinstimmung beider Systeme heraus.

Gegenüberstellung

1. Hamilton - Spritzensystem

Vorteil

Das dünne Nadelende, das in die vorgestanzten Löcher der Platte eingeführt wurde, hatte ein relativ kleines Lumen, so daß anhaftende Flüssigkeitsmengen an der Nadelspitze nach dem Einbringen der Serumprobe im Verhältnis zur Einfüllmenge gering waren.

Es ergaben sich hier zwei Möglichkeiten:

- a. Die Nadel wurde nach dem Aufziehen der Flüssigkeitsmenge abgetrocknet:

Die nach dem Einfüllen an der Nadel anhaftende Flüssigkeitsmenge verringert die geforderte Einfüllmenge von 0,002ml

- b. Die Nadel wurde nach dem Aufziehen der Flüssigkeitsmenge nicht abgetrocknet: Die Kontrolle, wieviel Flüssigkeit sich nach dem Aufziehen an die Nadel geheftet hatte, war nicht gegeben. Es konnten 0,002ml oder mehr eingefüllt werden, was von der jeweils anhaftenden Flüssigkeitsmenge nach dem Einbringen abhängig war. Diese Menge entzog sich aber unserer Kontrolle. Um die Untersuchung unter möglichst gleichen Bedingungen durchzuführen, wurden sowohl bei Hamilton als auch bei Dispenser die Einfüllenden grundsätzlich abgetrocknet. Der mögliche Fehler sollte durch die ganze Untersuchung weitgehend gleichgehalten werden.

Nachteil:

Bei der Hamilton-Spritze fungierte ein eingeschliffener Stahldraht als Spritzenstempel. Dieser Draht wirft beim Niederdrücken genau das Volumen aus, das in dem Glaskolben der Spritze zu sehen ist, abzüglich der Flüssigkeitsmenge, die sich in der Nadel selbst befindet. Der Drahtstempel kann nämlich nur im Glaskolben selbst bewegt werden und wirft nicht die Flüssigkeit aus der Nadel aus. Das Flüssigkeitsvolumen der Stahlnadel läuft daher stets als "totes" Volumen mit. Da das System aber vor Gebrauch mit verdünnter Kochsalzlösung luftleer gemacht wurde, pendelte hier ständig eine Säule

von NaCl-Lösung hin und her. Das zu untersuchende Serum kam an der Grenzfläche mit der Kochsalzlösung in Kontakt. Das Serum wurde dabei an der Grenzfläche wieder verdünnt, verunreinigte seinerseits aber die Kochsalzlösung mit seinen Bestandteilen. Es ergab sich somit die Notwendigkeit, nach jedem Einfüllvorgang die Kochsalzsäule in der Spritze zu reinigen, was ein wiederholtes Spülen notwendig machte. Der Nachteil bestand in dem zeitraubenden Säubern während und nach den Untersuchungen.

Die Verdünnungen der Seren an den Grenzflächen der Kochsalzsäule in der Spritze gingen als konstanter Fehler in die Untersuchung ein.

2. Dispenser - System

Vorteil:

Das Dispensersystem besteht aus einem Drahtstempel und in der Länge geeichten Glasröhrchen, die über den Drahtstempel geschoben werden. Am Kopf des Stahldrahtes befindet sich eine geeichte Skala. Die Glasröhrchen wurden für jedes Serum nur einmal verwendet. Der Stahldraht konnte leicht sauber gehalten werden. Das zeitraubende Säubern entfiel hier.

Nachteil:

Das Lumen der Glasröhrchen, in denen der Glasstempel läuft, ist im Verhältnis zu dem Volumen der Löcher in den Immundiffusionsplatten relativ groß. Die anhaftenden Flüssigkeitstropfen nach dem Einbringen in die ausgestanzten Löcher konnte verhältnismäßig groß sein. Ein weiterer Nachteil bestand in der Brüchigkeit der Glaskapillaren, deren Enden beim Aufsetzen auf der Platte leicht abbrechen.

Wie Abbildung 2 zeigt, stimmen die Ergebnisse beider Systeme in einem Vergleich aber gut überein, so daß wir nach dieser Untersuchung dem einfacher und schneller zu handhabendem Dispenser-System den Vorzug gaben.

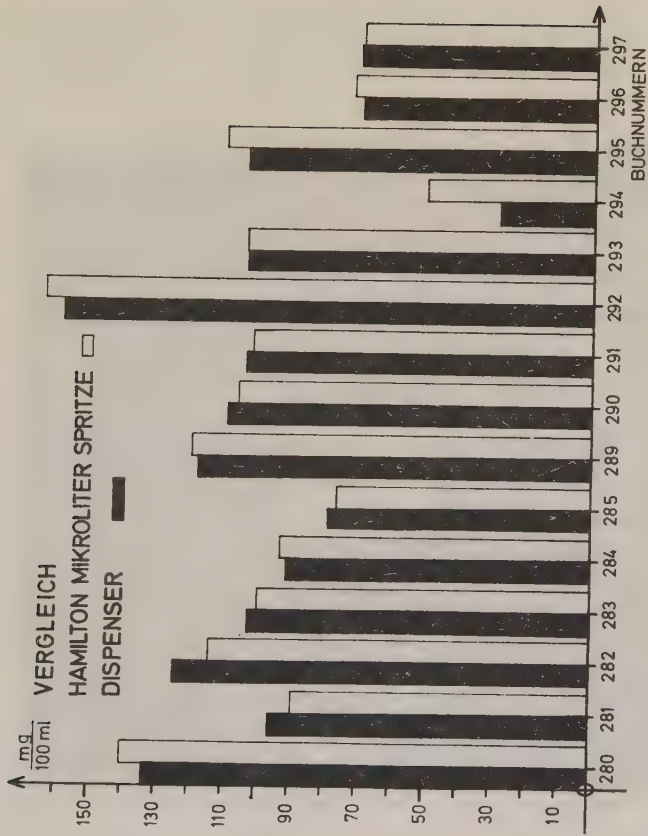


Abb. 2

3. Das Ablesen

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Genauigkeit von quantitativen Bestimmungen von Proteinen mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusions-Methode beeinflusst, ist die exakte Messung des Durchmessers der Präzipitationsringe. Hierzu bewährte sich eine Meßlupe mit eingravierter Zehntel-Millimeter-Skala. Die Messung der Durchmesser erfolgte nach Erreichen des Diffusionsendpunktes nach 48 Stunden.

Abgelesen wurde bei seitlicher, indirekter Beleuchtung gegen einen schwarzen Untergrund, indem die Meßlupe auf die Unterseite der Immundiffusionsplatte gesetzt wurde. Jeder Wert wurde doppelt abgelesen und ein Mittelwert gebildet. Das Ablesen wurde dadurch erschwert, daß sich die gräulich-transparenten Präzipitationsringe gegen die farblose Agar-Gelschicht und das farblose Gehäuse der Immundiffusionsplatten in ungünstigen Fällen nur kaum voneinander unterscheiden ließen. Andererseits bemühten wir uns um ein exaktes Ablesen auf 0,1mm Genauigkeit.

4. Bezugskurven und Auswertung

Das Standard-Humanserum hatte eine Konzentration von 75mg/100ml an Beta-1A/C-Protein. Durch die Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:6 1:2 und 1:1 (=unverdünnt) erhielten wir also Standardproben von 12,5, 37,5, und 75 mg Beta-1A/C-Globulin pro 100ml Serumverdünnung.

Der Durchmesser (2r) der Präzipitationsringe der Standardverdünnungen, nach 48 Stunden abgelesen, wurde quadriert und in einem Koordinatensystem auf der

Ordinate eingetragen. Auf der Abszisse wurde der Proteingehalt der Standardverdünnungen eingesetzt. Der Schnittpunkt der einander zugeordneten Werte ergaben die Punkte für die Eichgerade.

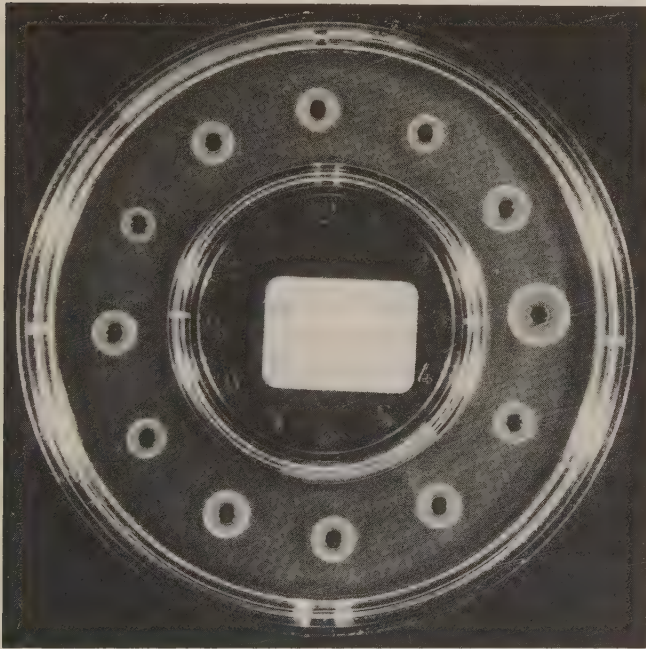


Abb.3 M-Partigen Immundiffusionsplatte für die einfache radiale Immundiffusion zur quantitativen Plasma-Proteinbestimmung.

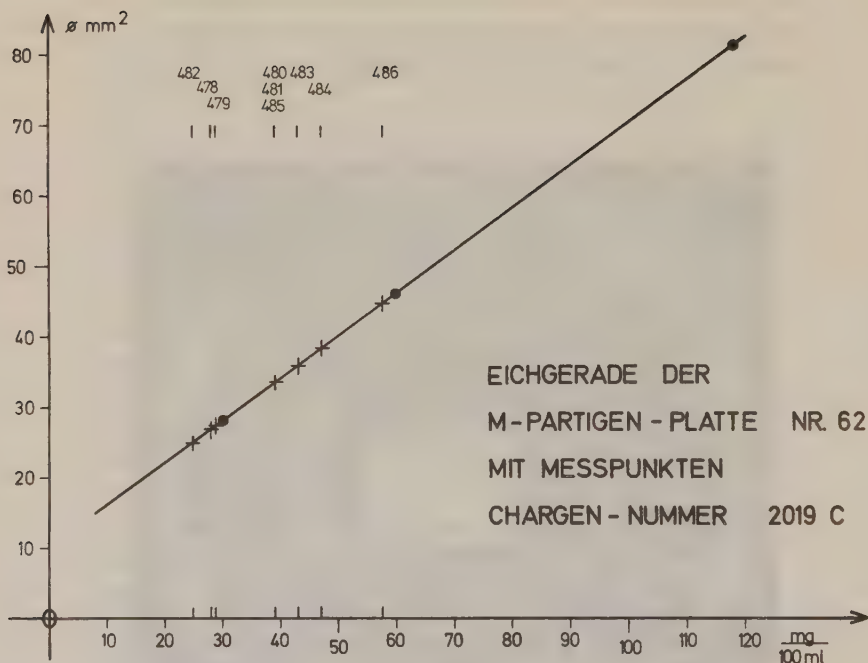


Abb. 4 Die Nummern 478-486 sind Nummern des Protokollbuches.

Durch Einsetzen der quadrierten Ringdurchmesser der auf Beta-1A/C-Globulin untersuchten Seren in die Eichgerade konnten auf der Abszisse Werte abgelesen werden, die mit dem Verdünnungsfaktor 3 (bei der späteren Plattenserie Verdünnungsfaktor 2) für die zu

untersuchenden Seren multipliziert, die gesuchten Beta-1A/C-Globulinwerte ergaben.

Nachdem bereits 68 Seren auf diese Weise untersucht worden waren, liefen die bisher verwendeten Partigen-Immundiffusionsplatten (Beta-1A/C) der Behring-Werke aus. Es kamen nun neue Platten als M-Partigen-Immundiffusionsplatten auf den Markt. Dieser Wechsel kam für uns unerwartet, stellte sich jedoch im weiteren Verlauf der Untersuchungen als Verbesserung heraus.

Ein Hauptcharakteristikum der neuen Platten war die auf das zweieinhalbfache vergrößerte Einfüllmenge der zu untersuchenden Seren. Die ausgestanzten Löcher der Platte waren nun auf 0,095ml geeicht. Der Fehler der anhaftenden Flüssigkeitsmenge beim Dispensersystem verringerte sich somit im Vergleich zur geforderten Einfüllmenge, was den Nachteil des Dispensersystem noch weiter verringerte.

Die schlechte Erkennbarkeit der Präzipitationsringe gegen die farblose Umgebung wurde dadurch aufgehoben, daß das Gehäuse der Platte nun grün eingefärbt war. Die abzumessenden Ringe hoben sich nun deutlicher hervor.

Das Standard-Serum mußte nicht mehr selbst verdünnt werden und wurde nun in standardisierten Verdünnungen als Protein-Standard-Serum B geliefert. Dadurch entfiel der variable Verdünnungsfehler.

I	Verdünnung:	30mg/100ml
II	Verdünnung:	60mg/100ml
III	Verdünnung:	180mg/100ml

OP Nr. 472 A

Stabilisationszusatz: Proteasen-Inhibitor

Konservierungsmittel: Natriumacid (1mg/ml)

Außerdem wurde der Meßbereich von 10 - 80mg/100ml bei der Partigen-Immun-Diffusionsplatte auf 10 - 120 mg/100ml erweitert. Die Platten hatten die OP Nr. 1856 A bzw. 2019 C.

Auch die Verdünnung der zu untersuchenden Seren war nun mit 1:2 geringer als bei der ursprünglichen Versuchsanordnung. Eventuelle Ungenauigkeiten gingen nunmehr lediglich mit einem Faktor 2 in die Ergebnisse ein.

Für jede Partigenplatte wurde eine Eichgerade angefertigt.

IV KLINISCHES MATERIAL

1.

Untersucht wurden 583 Seren von Kindern in den Altersgruppe 1 (Nabelvenenblut) bis 16 (Kinder über 10 Jahren).

Das Untersuchungsgut wurde ohne Vorauswahl aus den täglich im Labor einlaufenden Blutproben herausgenommen.

Durch die einzelnen Untersuchungen hindurch waren die Seren lediglich durch ihre Labornummern bekannt.

Durch die willkürliche Herausnahme von Blutproben aus einem Kollektiv, ließen sich Mehrfachbestimmungen von einzelnen Probandenserum, die wiederholt zur Untersuchung geschickt wurden, nicht vermeiden. Die mehrfach bestimmten Werte wurden nach der Identifizierung der Seren später wieder aus dem Kollektiv herausgenommen.

2.

Die Seren wurden durch Zentrifugieren bei 3.000 U/min. von den zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt.

Die Serumproben wurden auf 1:3 anfangs bei den Partigen-Immundiffusionsplatten, später auf 1:2 bei den M-Partigenplatten mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Dies erfolgte mit Mikroliterpipetten.

In die Partigenplatten wurden die Verdünnungen mit den oben erwähnten Systemen eingefüllt. Schließlich beschränkten wir uns auf das Dispensersystem der Behring-Werke.

3.

Folgende Bestimmungen wurden durchgeführt:

- C'3-Komplementanteil (als Bestandteil dieser Arbeit)
- Gesamteiweiß
- Proteinspektrum in der Elektrophorese
- Proteinspektrum in der Immunelektrophorese

Der Versuch, bei allen Serumproben alle vier Bestimmungen gleichzeitig durchzuführen, gelang nicht immer, da die Serummenge oft nicht ausreichte.

Nach Abschluß der klinisch-chemischen Untersuchungen wurden die Seren über die Labornummern den Krankengeschichten zugeordnet.

4.

Anhand der klinischen Diagnosen und der vorhandenen Werte von Gesamteiweiß, Elektrophorese und Immunelektrophorese wurden die Seren charakterisiert und eingeordnet.

Bei Erkrankungen, bei denen bereits in der Literatur auf mögliche erhöhte oder erniedrigte Werte von Beta-1A/C hingewiesen wurde, sonderten wir die Seren aus dem Untersuchungsgut aus. Auch Patienten mit erfolgter Bluttransfusion wurden nicht berücksichtigt.

Dieses Verfahren stellte sich als etwas umständlich dar, resultiert aber aus dem Bemühen, ein Kollektiv

zu erhalten, das sich aus möglichst zufällig herausgenommenen normalen Seren zusammensetzt, um nicht von vornherein unwillkürlich eine Auswahl zu treffen.

Für die Auswertung kamen 496 Seren in Betracht.

V UNTERSUCHUNGEN

1.

Sobald die verbliebenen 496 Werte den Altersgruppen 1 bis 16 zugeordnet waren, wurden innerhalb der einzelnen Gruppen die

- Mittelwerte
- Varianz
- Standardabweichungen

der Beta-1A/C-Werte bestimmt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in einer Übersichtstabelle zusammengefaßt. In einer Graphik wird die Abhängigkeit zwischen Altersgruppen und Mittelwerten-Standardabweichungen anschaulich gemacht.

2.

Die Gesamteiweiß-Werte, die neben den Beta-1A/C-Bestimmungen für jede der einzelnen Serum-Proben mitbestimmt wurden, konnten ebenfalls in Abhängigkeit zu den Altersgruppen gebracht werden. Das Verhalten

der Mittelwerte und Standardabweichungen in den Altersgruppen zeigt ebenfalls eine Graphik.

3.

Über einen Zeitraum von vier Wochen (18.10.72 bis 27.11.72) wurden willkürlich herausgegriffene Serumverdünnungen (1:2) sechsmal bei -18°C eingefroren und wieder aufgetaut. Nach jedem Auftauen wurden die Beta-1A/C-Werte der Proben neu bestimmt. Die Werte wurden in Verlaufskurven zusammengefaßt und zeigen das Verhalten der C γ 3 Komplement-Serum-Fraktion über diesen Zeitraum.

VI ERGEBNISSE

1.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen der Menge von Beta-1A/C-Globulin in mg/100ml von 496 Seren sind als Mittelwerte und Standardabweichungen ihren Altersgruppen zugeordnet.

Um den Konzentrationssprung zwischen erster und zweiter Altergruppe genauer beurteilen zu können, wurde die zweite Gruppe (0-14 Tage) nochmals aufgeteilt:

- | | |
|----------------|----------------------------|
| a) 0 - 3. Tag: | $59,27 \pm 18,24$ mg/100ml |
| b) 4.-14. Tag: | $54,36 \pm 14,14$ mg/100ml |

Es besteht demnach ein Konzentrationsgefälle zwischen dem Mittelwert des C¹³-Gehaltes im Nabelvenenblut und der C¹³-Konzentration im Serum von Neugeborenen. Der Serumspiegel scheint in den ersten Tagen noch weiter abzusinken. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von H.Geiger und P.Hoffmann (34) und bestätigt die tiefen Werte von P.Propp und A.Alper (35).

Die durchschnittlichen Erwachsenenwerte sind annähernd nach etwa 12-36 Monaten erreicht. (8) :

o -12. Monat	68,43 mg/100ml Beta 1A/C
13.-36. Monat	91,88 mg/100ml Beta 1A/C
37 Monate bis über 10 Jahre	91.10 mg/100ml Beta 1A/C

TABELLE DER ALTERSABHÄNGIGEN MITTELWERTE
VON BETA-1A/C MIT STANDARDABWEICHUNGEN

ALTERS- GRUPPEN	MITTEL - WERTE $\frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}}$	STANDARDAB- WEICHUNGEN	AN- ZAHL
1 NABELVENE	66,97	$\pm 12,66$	76
2 bis 2.WOCHE	56,81	$\pm 16,31$	42
3 2. - 4.WOCHE	65,98	$\pm 21,18$	15
4 1. - 4.MONAT	77,55	$\pm 19,98$	46
5 4. - 8.MONAT	77,35	$\pm 15,01$	21
6 8. - 12.MONAT	73,74	$\pm 22,53$	20
7 12. - 18.MONAT	85,87	$\pm 22,64$	18
8 18. - 24.MONAT	104,61	$\pm 24,60$	14
9 3. JAHR	85,18	$\pm 22,19$	27
10 4. JAHR	87,50	$\pm 16,74$	22
11 5. JAHR	90,48	$\pm 14,04$	30
12 6. JAHR	95,81	$\pm 18,98$	25
13 7. JAHR	88,76	$\pm 19,42$	37
14 8. JAHR	92,24	$\pm 16,81$	25
15 9. JAHR	90,00	$\pm 12,89$	19
16 über 10. JAHR	92,93	$\pm 15,66$	59

Tab. 2

Die unterschiedliche Anzahl von Werten in den einzelnen Altersgruppen resultiert aus dem oben angegebenen Verfahren, ein zunächst anonymes Kollektiv von Seren zu erhalten. Die Zugehörigkeit zu den einzelnen Gruppen ergab sich erst bei der Identifizierung nach Abschluß der Untersuchung.

Die Einteilung der Altersgruppen erfolgte zunächst willkürlich, es zeigte sich aber, daß das Ansteigen der Mittelwerte eine gewisse Kontinuität aufwies. Es wurde daher auch keine Umgruppierung vorgenommen. (Ähnliche Einteilung auch bei (25)). Die Tabelle zeigt, daß die Mittelwerte für die Beta-1A/C-Globulin-Konzentrationen von der ersten Lebenswoche an (56,8mg/100ml) bis zum Alter von über 10 Jahren (92,93mg/100ml) um über 30% ansteigen.

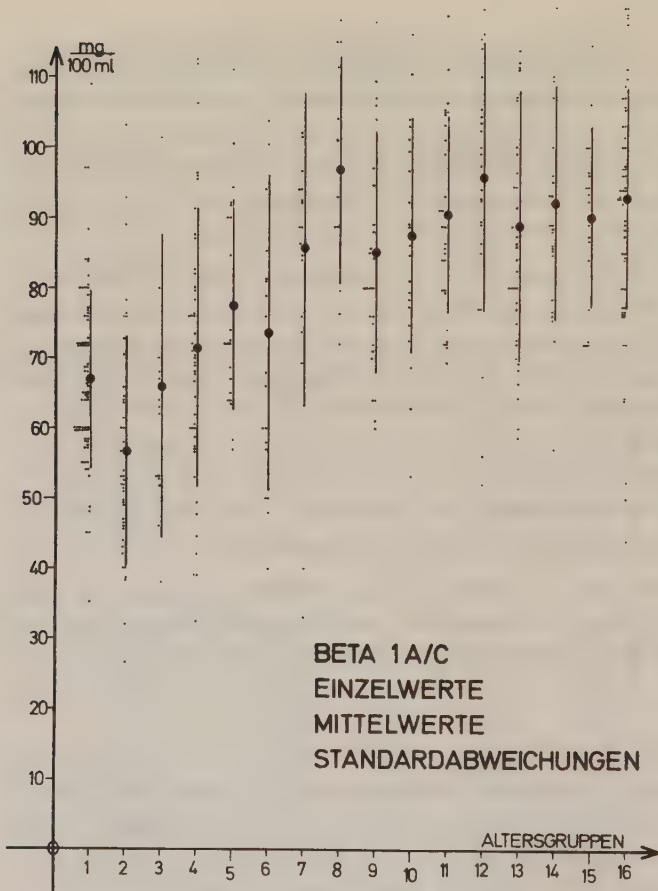
Trotz einer mittleren Standardabweichung von $\pm 18,23$ ist daher die Kenntnis vom Konzentrationsverlauf der Beta-1A/C-Globulin-Konzentration bei Kindern nötig.

2.

Die Abbildung 5, die auf den Werten der Tabelle 2 beruht, zeigt die Abhängigkeit der Mittelwerte und Standardabweichungen von ihren Altersgruppen. Ebenso sind die Werte der Einzelbestimmungen ihrer Gruppenzugehörigkeit nach eingezeichnet.

Hier lassen sich relativ große Streubreiten der Beta-1A/C-Einzelwerte gut erkennen. Die errechneten Standardabweichungen sind als senkrechte Striche eingetragen. Die Mittelwerte wurden durch kräftige Punkte hervorgehoben.

Abb. 5



Altersgruppen:

- | | | |
|-----------------|------------------|-------------------|
| 1. Nabelvene | 6. 8.-12. Monat | 11. 5. Jahr |
| 2. bis 2. Woche | 7. 12.-18. Monat | 12. 6. Jahr |
| 3. 2.-4. Woche | 8. 18.-24. Monat | 13. 7. Jahr |
| 4. 1.-4. Monat | 9. 3. Jahr | 14. 8. Jahr |
| 5. 4.-8. Monat | 10. 4. Jahr | 15. 9. Jahr |
| | | 16. über 10. Jahr |

Die Abbildung 5 zeigt die großen Streubereiche der Beta-1A/C Konzentrationen. Die Mittelwerte verhalten sich relativ gleichmäßig und beschreiben einen ansteigenden Kurvenverlauf mit Annäherung an einen geschätzten festen Wert von 90mg Beta-1A/C pro 100 ml.

3.

Die zusätzlich ermittelten Mittelwerte der Konzentrationen für Gesamteiweiß zeigen ein ganz ähnliches Ansteigen wie es auch für die Beta-1A/C-Globulinwerte gefunden wurde.

Das stimmt damit überein, daß der Charakter des C₃-Komplementfaktors als Beta-Globulin und damit als Bestandteil der Eiweißfraktion längst bekannt ist.

Die Abhängigkeit von Konzentrationen des Gesamteiweißes vom Alter der Kinder entspricht den Ergebnissen auch anderer Untersucher. (25)

Auffallend ist die Ähnlichkeit des Ansteigens der Mittelwerte in beiden verglichenen Abbildungen.

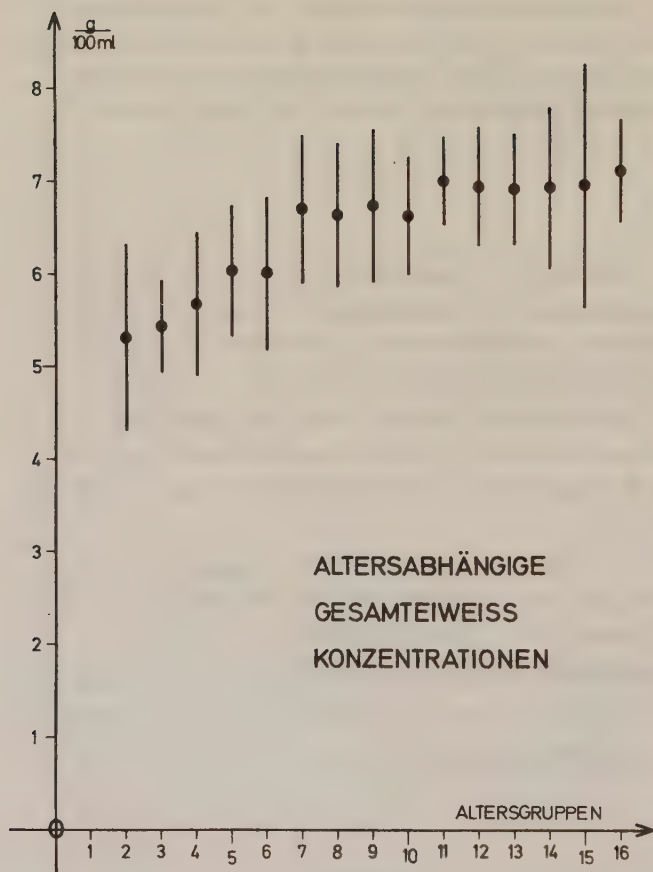


Abb. 6

4.

Im Verlauf der Versuche gewann die Frage nach dem Verhalten der Beta-1A/C-Konzentrationen im Rahmen der Serumalterung an Bedeutung

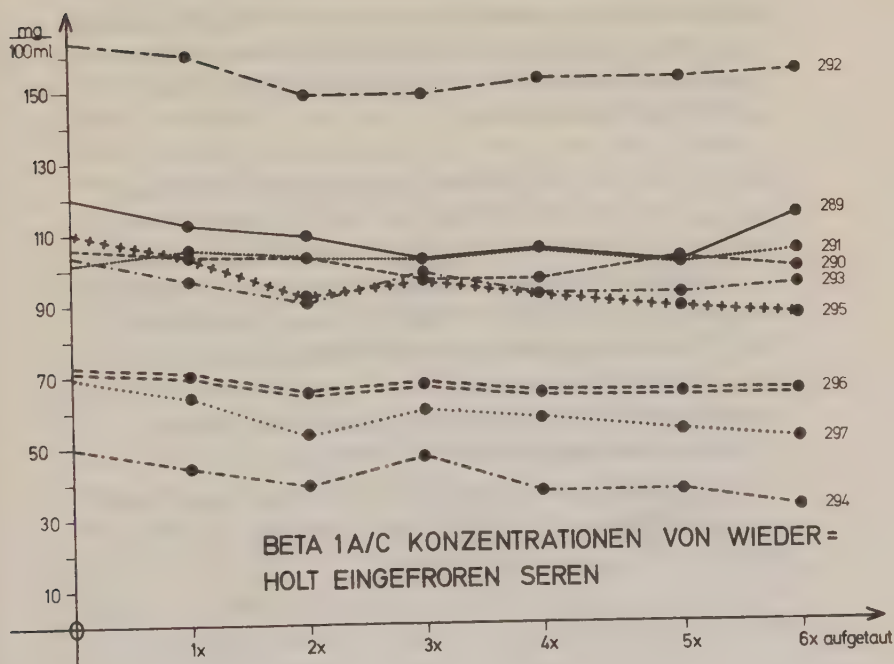


Abb.7.

Die Abbildung zeigt das Verhalten der Serumwerte vom C'3-Komplementanteil nach wiederholtem Ein-

frieren über einen Zeitraum von vier Wochen. Die Verlaufskurven zeigen, daß sich die Werte innerhalb einer gewissen Schwankung konstant verhalten.

Die offensichtlichen Schwankungen können aus der Fehlerbreite der Methodik hervorgehen.

Dies scheint die Beobachtungen zu bestätigen, nach denen zwar die Menge an Beta-1A bzw. Beta-1C im Serum gleichbleibt, nicht aber das Verhältnis Beta-1A zu Beta-1C. (17)

Auch wirkt sich der Verlust an biologischen Funktionen, der sehr bald nach der Blutentnahme einsetzt, nicht auf den C'3-Gehalt im Serum aus, da durch die Bestimmung des Beta-1A/C-Anteils mittels der einfachen radialen Immundiffusion lediglich die Proteinkonzentrationen im Serum ermittelt werden. Dieser Proteingehalt kann aber ein für die Komplementreaktion inaktiver Eiweißkomplex oder aber ein durchaus reaktiver Eiweißanteil sein.

Auf die Aktivität des Komplementsystems kann durch die Bestimmung des C'3-Anteils daher nur mit Vorbehalt rückgeschlossen werden.

VII DISKUSSION

1.

Auffallend ist die große Streuung der Einzelwerte bei der Bestimmung des Beta-1A/C-Globulins im Serum.

Ein erniedrigter oder erhöhter Wert von Beta-1A/C im Serum kann auf Komplementveränderungen bei entsprechenden Krankheiten hinweisen. Auch bei einigen Verlaufsbestimmungen zeigen sich schwankende Werte. Man kann sich daher bei der Diagnosestellung nicht auf einzelne Werte stützen, sondern die Bestimmungen müssen wiederholt werden. Nur dann können gehäuft tiefe Werte oder gehäuft hohe Werte eine Aussagekraft bekommen, wie es bei einigen Erkrankungen auch für die Prognose bereits der Fall ist. (Hepatitis, Pcp, lymphatische Krankheiten u.a.)

Um die Bestimmungen von Beta 1A/C-Konzentrationen aber auch im Kindesalter einstufen zu können, benötigt man einen Anhalt für das "normale" Verhalten der C'3 Konzentrationskurve in Abhängigkeit vom Alter der Kinder.

Für die klinische Routinearbeit zur Untersuchung von Beta-1A/C-Konzentrationen im Serum stellt die Methode der einfachen radialen Immundiffusion nach Mancini et al. eine brauchbare Untersuchungsmöglichkeit dar.

Durch die gut reproduzierbaren Ergebnisse empfiehlt sich diese Methode, da im Vergleich zur Messung der 50%-Hämolysseaktivität nur ein geringer technischer Aufwand nötig ist.

Allerdings muß auf ein genaues Beachten der Verarbeitungsvorschriften der Lieferfirmen hingewiesen werden, da wie alle immunologischen Bestimmungsmethoden diese relativ empfindlich ist.

2.

Da sich die Beta-1A/C Serumkonzentrationen auch über einen längeren Zeitraum konstant verhalten, kann deren Bestimmung auch nach einem längeren Zeitraum erfolgen, ohne daß eine negative Auswirkung auf die Genauigkeit befürchtet werden muß.

Es scheint daher auch nicht erforderlich zu sein, wie es bei dieser Untersuchung gehandhabt wurde, die Seren unmittelbar nach der Blutentnahme zu untersuchen.

3.

Bei der Bestimmung der C'3-Komplementkonzentrationen stellte sich ein signifikantes Konzentrationsgefälle zwischen dem Nabelvenenblut und der Blutkonzentration bei Neugeborenen heraus.

Der Serumspiegel scheint in den ersten Tagen noch weiter abzusinken (34,35), erreicht aber nach etwa 12 Monaten Erwachsenenwerte.

Das Gesamtkomplement hat ein Molekulargewicht von 185 000 und liegt damit in der Größenordnung des IgG mit 150 000 .

Ein diaplazentarer Austausch des C'3 -Anteils wird aber von Propp und Alper (35) verneint. Es fand sich kein phänotypisches C'3 der Mutter in dem Blut des Neugeborenen und umgekehrt.

Auf der Grundlage der Untersuchung von Unterschieden des Phänotypus der Proteine zwischen Mutter und Fetus zeigten Propp P.R. und Alper Ch.A. ferner

Anhaltspunkte auf, die den Schluß zulassen, daß der C'3-Komplementanteil im Fetus gebildet wird. (Beta-1A/C ist bereits in der 9. Woche im Fetus nachzuweisen.)

Auch sprechen Befunde dafür, daß die C'3-Komplementkonzentration im mütterlichen Serum zur Zeit der Geburt signifikant erhöht ist.

Der Konzentrationsunterschied ließe sich daher durch die unterschiedlichen C'3-Komplementkonzentrationen im mütterlichen Blut und dem des Feten erklären, dessen Beta-1A/C-Globulinproduktion post partum verstärkt und auf den Stand der Erwachsenenwerte gebracht wird.

Die Frage nach dem Absinken der Beta-1A/C-Konzentrationen während der ersten zwei Wochen nach der Geburt bleibt nach der Verneinung der diaplazentaren Übergänge daher unbeantwortet (physiologisches Konzentrationsgefälle nach der Geburt?).

VIII Zusammenfassung

1.

Der C'3 Komplementanteil, in der Immunelektrophorese als Beta-1A/C-Globulin sichtbar, wurde in Abhängigkeit zu sechzehn Altersgruppen von Kindern zwischen dem ersten Lebenstag und dem Alter von über 10 Jahren gebracht.

Es wurden 496 Seren ausgewertet und die Mittelwerte und Standardabweichungen abhängig vom Kindesalter dargestellt.

Als Untersuchungsmethode wurde die einfache radiale Immundiffusion, angegeben von Mancini und Mitarbeitern, herangezogen.

2.

Die Ergebnisse sind als "Normwerte" mit der zugehörigen biologischen Streubreite aufzufassen.

3.

Anhand dieser "Normwerte" können in Verlaufsuntersuchungen pathologische Veränderungen und Krankheitsverläufe durch erniedrigte oder erhöhte Werte erfaßt werden.

4.

Die Beta-1A/C-Konzentrationen im Serum bleiben auch über einen längeren Zeitraum und auch nach wiederholtem Einfrieren konstant. Dies erleichtert die klinische Routinearbeit, da die Séroen ohne Verlust an Genauigkeit auch längere Zeit nach der Blutabnahme untersucht werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) HUMPHREY J.H., R.G.WHITE:
Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Hsg. Egon
Macher, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971
- 2) WASSERMANN H.J., A.NEISSER, C.BRUCK:
Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphillis
Dtsch.med.Wschr. 32, 745 (1906)
- 3) BITTER-SURMANN D.:
Aktivierung des Komplementsystems. Ein Mono-
pol des Immunkomplexes? Klin.Wschr. 50, 277-
286 (1972)
- 4) RAPP H.J., T.BORSOS:
Molecular basis of complement action. New
York: Appleton-Century-Crofts, Meredith
Corporation 1970
- 5) FISCHER H., I.HAUPT:
Serumkomplement. In: Immunchemie, Hsg. von
O.Westphal, Springer, Berlin 1965
- 6) STEFFEN C.:
Allgemeine und experimentelle Immunologie
und Immunpathologie sowie ihre klinische
Anwendung.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968

- 7) GROB P.J. und H.JEMELKA:
Die Beta-1A-Bestimmung in der Klinik.
Schweiz.med.Wschr. 101, 223-228 (1971)
- 8) BLÄKER F., K.FISCHER und P.WITTE:
Quantitative Komplementanalysen (C₃) mit
der radialen Immundiffusion bei Erkrankungen
mit gestörter Immunitätslage.
Dt.med.Wschr. 39, 1978-1982 (1969)
- 9) GRABAR P., P.A.MIESCHER:
Immunadherence. In: Immunpathologie 2nd.
Internat.Symposion, eds. Basel-Stuttgart:
Schwabe & Co. 1962
- 10) MANCINI G., J.P.VAERMAN, A.O.CARBONARA und
J.F.HEREMANS:
A, single-radial-diffusion method for the
immunological quantitation of proteins.
In: H.Peters, Proc. IX Coll. Protides of
the Biological Fluids, 370-373. Amsterdam:
Elsevier 1964
- 11) NILSSON U., MÜLLER-EBERHARD:
zit. in Müller-Eberhard H.: Immunchemie,
S. 181, Hsg.von O.Westphal, Springer, Berlin 1965
- 12) KABAT E., M.MAYER:
Experimental immunochemistry, 2.Aufl. Thomas,
Springfield 1961

- 13) MAYER, M.
Development of the one-hit-theory of
immune hemolysis. In: Immunological
approaches to problems in mycology.
S. 268; hsg. von M. Heidelberger,
O. Plescie. New Rutgers Univ.Press,
Brunswick 1961
- 14) MAYER, M.:
Mechanism of hemolysis by complement.
In: Ciba Found. Symp. on Complement
Churchill, London 1965
- 15) BAUER, R., J. WEISS:
Über den Komplementgehalt des mensch-
lichen Serums. Med.Klin. 26, 1635-1636
(1930)
- 16) VEILL, W.H., B. BUCHHOLZ:
Der Komplementschwund im Blute. Eine
bedeutsame immunbiologische Reaktion
beim rheumatischen Infekt und ihre Be-
ziehung zur allgemeinen Pathologie
des Rheumatismus. Klin.Wschr. 11, 2019-
2021, (1932)
- 17) MARGHESCU, S.:
Über die quantitative Bestimmung des
Komplements mittels Immundiffusion.
Klin.Wschr. 18, 991-995 (1968)

- 18) WADSWORTH, A., E.MALTANER, F.MALTANER:
The quantitative determination of the
fixation of complement by immune serum
and antigen. Immunol. 21, 313-340 (1931)
- 19) KABAT, E.A. und M.M.MAYER:
Experimental immunochemistry, 2nd.ed.,
2nd printing. Springfield: Ch.C. Thomas
1964
- 20) LEPOW, I.H.
Serum complement an properidin. In:
M. Samter and H.L. Alexander, Immuno-
logical diseases. London: J. & A. Chur-
chill Ltd. 1965
- 21) MÜLLER, R. und R. BRANDT:
Wassermannreaktion (Theorie und Metho-
dik). In: J. Jadassohn. Handbuch der
Haut- und Geschlechtskrankheiten. Bd.
XV/2 S. 285-383. Berlin: Springer 1929
- 22) MARGHESCU, S.:
Über die quantitative Bestimmung der
Immunglobuline und die Komplementaktivi-
tät im Blutserum bei Dermatosen.
1. Mitteilung: Einleitung, Methoden und
ihre kritische Beurteilung. Arch.klin.
exp.Derm. 231, 120-129 (1968)

- 23) GEYER, E., S. MARGHESCU und S. S. MÜLLER:
Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese:
Versuche zur Isolierung und Charakteri-
sierung von Humanserumproteinen. Klin.
Wschr. 45, 717-721 (1967)
- 24) HEREMANS, J. F.:
Die Immunelektrophorese und ihre klin.
Bedeutung. In: L. Heilmeyer, R. Scheon,
B. de Rudder und A. Prader. Ergebnisse der
inneren Medizin und Kinderheilkunde, Bd. 20
S. 169-257, Berlin-Göttingen-Heidelberg:
Springer 1963
- 25) DOCUMENTA GEIGY:
Wissenschaftliche Tabellen, Hsg.: J. R.
Geigy A. G., Pharma, Basel, S. 79 (1968)
- 26) MÜLLER-EBERHARD:
Chemie der Komplementfaktoren. In: Immun-
chemie, Colloquium d. Ges. für Physiologische
Chemie. Hsg. von O. Westphal, Springer,
Berlin 1965
- 27) MEIER E. CH., P. J. GROB:
Die Bestimmung von Beta-1A/C (Komplementfak-
tor 3) bei malignen Lymphomen, Myelomen und
Morbus Waldenström. Dt. Med. Wschr. Nr. 97
(967-971) 1972

- 28) KLEMPERER M.R., GOTOFF S.P., ALPER C.A., LEVIN A.S. und ROSEN F.S.:
Estimation of serum Beta-1C-Globulin: Its relation to the serum hemolytic complement titer. Pediatrics 35 (765-769) 1965
- 29) GOTOFF S.P., ISAACS E.W., MUERCKE R.C. und SMITH R.D.:
Serum Beta-1C-Globulin in Glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus.
Ann. intern. Med. 71 (327-333) 1969
- 30) MORSE J.H., MÜLLER-EBERHARD H.J. and KUNCKEL H.G.:
Antinuclear factors and serum complement in systemic lupus erythematosus.
Bull N.Y. Acad.Med. 38, 641 (1962)
- 31) OGG C.S., CAMERON J.S. und WHITE R.H.R.:
The C³ component of complement (Beta-1C-Globulin) in patients with heavy proteinuria.
Lancet 1968/II (78-81)
- 32) POGGLITSCH H., GIESSAUF W., FELDNER H. und STÖCKL G.:
Die Beta-1A-Globulin-(C³)Konzentration im Serum bei akuten und chronischen Nephropathien und rheumatischen Erkrankungen.
Wiener Med. Wschr. 21 (381-385) 1970

- 33) TANNER E., KÜHN R.A., KUHNATH H. und STELZNER A.:
Zur Bedeutung von Komplement und Immunglobu-
linen in der aktiven Phase der Polyarthri-
tis chronica progressiva.
Dtsch.Ges.Wesen 8 (637-641) 1973
- 34) GEIGER H. und P.HOFFMANN:
Quantitative immunologische Bestimmung von
sechzehn verschiedenen Serumproteinen bei
260 normalen 0-15 Jahre alten Kindern.
Zeitschr.f.Kinderheilkunde 109 (22-40) 1970
- 35) PROPP P.R., ALPER CH.A.:
C³ Synthesis in the Human Fetus and Lack of
Transplacental Passage .
Science Val 162 (672-673) 1968

LEBENS LAUF

Am 19. März 1945 wurde ich als Sohn des Architekten Arthur Ewert und seiner Frau Edith, geb. Rothenberg, in Bad Wiessee geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Kaufbeuren und Bad-Wörishofen, später die Oberrealschule in Mindelheim, Hohenschwangau und Kaufbeuren.

1966 bestand ich das Abitur am Staatlichen Gymnasium in Kaufbeuren.

Es folgten zwei Jahre Wehrdienst.

Das Studium der Zahnmedizin begann ich im Wintersemester 1969/70, nachdem ich zwei Jahre Naturwissenschaften studiert hatte.

Im Juli 1974 legte ich das Staatsexamen an der Universität München ab.

Meine Doktorarbeit wurde während der klinischen Semester an der Universitäts-Kinderklinik bei Herrn Privatdozent Dr. K.-D. Tympner begonnen und im Frühjahr 1974 abgeschlossen.

